

10/521454  
Rec'd PCT/PTO 14 JAN 2005  
PCT/JP03/02342

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

28.02.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 7月17日

REC'D 25 APR 2003

出願番号

Application Number:

特願2002-208568

WIPO

PCT

[ST.10/C]:

[JP2002-208568]

出願人

Applicant(s):

理化学研究所  
科学技術振興事業団

PRIORITY

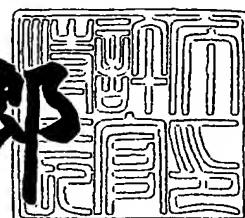
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3024675

【書類名】 特許願

【整理番号】 021297

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【提出日】 平成14年 7月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07H

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

【氏名】 平尾 一郎

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 理化学研究所 横浜研究所内

【氏名】 横山 茂之

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

【氏名】 平尾 路子

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市中央1-3-3-502

【氏名】 三井 雅雄

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2

06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠式

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100080137

【弁理士】

【氏名又は名称】 千葉 昭男

【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【選任した代理人】

【識別番号】 100107386

【弁理士】

【氏名又は名称】 泉谷 玲子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な非天然型塩基を有するヌクレオシド又はヌクレオチド及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項1】

5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチド。

【請求項2】

前記塩基の5位が、以下の

- 1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基；
- 2) アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体；
- 3) ピオチン；あるいは
- 4) フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、テトラメチル-6-カルボキシローダミン、及びそれらの誘導体から選択される蛍光分子からなるグループから選択される置換基によって置換されている、請求項1に記載のヌクレオシド又はヌクレオチド。

【請求項3】

前記塩基の5位が、1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基、あるいは2) アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体、で置換されている、請求項1又は2に記載のヌクレオシド又はヌクレオチド。

【請求項4】

前記塩基の5位がヨウ素で置換されている、請求項1ないし3のいずれか1項に記載のヌクレオシド又はヌクレオチド。

【請求項5】

請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヌクレオチドが組み込まれた、核酸

【請求項6】

請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヌクレオチドと、6位置換された2-アミノープリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドとが塩基対を形

成している、請求項5に記載の核酸。

【請求項7】

前記6位置換された2-アミノープリン-9-イル基が2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン-9-イル基又は2-アミノ-6-(ジメチルアミノ)プリン-9-イル基である、請求項6に記載の核酸。

【請求項8】

アンチセンスDNA若しくはRNA、リボザイム又はアプタマーとして使用される、請求項5に記載の核酸。

【請求項9】

タンパク質、ペプチドの全体又は一部をコードする、請求項5に記載の核酸。

【請求項10】

請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヌクレオチドが組み込まれた、核酸を調製する方法であって、

6位置換された2-アミノープリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸を錆型として転写、複製又は逆転写を行い、前記6位置換された2-アミノープリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドの相補的な位置に、請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヌクレオチドを組み込むことを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な非天然型塩基を有するヌクレオシド又はヌクレオチド及びその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体高分子である核酸(DNA, RNA)は、生命活動に必要となる膨大な量の遺伝情報を、僅か4種類の塩基の組合せからなる配列として記録している。また、核酸は自己自身を錆型としてDNAポリメラーゼにより自己複製し、さらにRNAポリメラーゼによる転写、リボソームによる翻訳というプロセスを介して

、DNAからDNAへ、DNAからRNAへ、RNAからタンパク質へと遺伝情報を伝達する。この遺伝情報の複製と伝達を可能としているのは排他的な塩基対形成（A・T／U、G・C）のルールである。また、核酸は、多様な高次構造を形成して様々な機能を発揮する。例えば、*in vitro*セレクション法によって、アプタマーやリボザイムの機能を有する新規核酸がこれまでに多数見つかったこともその一つである。

## 【0003】

しかし、20種類のアミノ酸からなるタンパク質に比べて、天然の核酸には4種類の塩基（2種類の塩基対）しかないという事実は、核酸の化学的・物理的多様性に限界を与えている。たとえば、生体中のtRNA、rRNA、mRNA等の機能性RNAは自分自身の構造を安定化したりRNA・RNA間、RNA・タンパク質間相互作用を安定化するために、様々な修飾塩基を利用している。したがって、新規機能性核酸の開発において、新たな塩基（対）のレパートリーを増やすことは大変有益であると考えられる。

## 【0004】

核酸のさらなる機能拡張をめざして、非天然型塩基をもつヌクレオシド又はヌクレオチドの創製への取り組みが行われている。核酸に修飾塩基（もしくは非天然型塩基）を導入する手法として、1) 化学合成により直接導入する方法、2) 核酸合成酵素により導入する方法が考えられる。1) の場合は、アミダイトユニットの安定性や塩基部分の適当な保護基が存在すること等化学合成上の問題の解決が必要である。また、これらの問題が解決されれば様々な非天然型塩基を位置選択的に導入できるが、その核酸の増幅は困難であり、長鎖長の核酸の合成も難しくなる。2) の場合は、もし、基質が酵素に認識され、人工塩基対間で相補的に複製、転写されれば、その核酸の増幅・調製が可能となるが、そのような基質や塩基対（非天然型ヌクレオチド）も未だ開発途中である。

## 【0005】

非天然型人工塩基対の背景

天然の二本鎖DNA中のAとTおよびGとCは、それぞれ特異的な水素結合を介して互いに「排他的」な塩基対を形成している（図1a）。Bennerのグ

ループはこの水素結合の様式に着目し、天然型塩基対の水素結合の組み合わせとは異なる新たな塩基対をデザインした。中でもisoG・isoCおよび(X・X塩基対(図1b))は、いろいろな核酸合成酵素によるDNA、RNA分子中への取り込みについての解析が報告されている [Piccirilli et al., 1990; Piccirilli et al., 1991; Switzer et al., 1993]。

## 【0006】

しかしながら、1) isoGは1位と2位の間でケト・エノールの互変異性をおこすため、Tとも塩基対を形成してしまうこと、2) 最近の核酸合成酵素のX線結晶構造解析から核酸合成酵素との相互作用に重要である2位のケト基がisoCやKではアミノ基となっているため、核酸合成酵素の種類によっては基質として認識されないこと、3) isoCのヌクレオシド誘導体が化学的に不安定であること等の問題があり、これらの非天然型塩基対は現在ではほとんど使われていない。

## 【0007】

一方、塩基の疎水性に着目して、水素結合をなくした疎水性塩基対がアメリカのグループから新たにデザインされた。まずKoollらのグループは、水素結合のドナーやアクセプターとなる原子および官能基を含まないアデニン誘導体とチミン誘導体をそれぞれ合成し、DNAへの取り込みを調べた。アデニン誘導体に相当するのが、4-メチルベンズイミダゾール(Z)あるいは9-メチル-1-Hイミダゾ[4,5]-b]ピリジン(Q)であり、チミン誘導体に相当するのが、2,4-ジフルオロトルエン(F)である(図1c)。これらの疎水性塩基対は対合する塩基間で水素結合をもたないが、大腸菌由来DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントにより相補的にDNA中に取り込まれ、またA・F、Q・T、Z・Tといった塩基対もそれぞれ相補的に取り込まれることが示された [Morales & Kool, 1999]。

## 【0008】

その後、RomesbergとSchultzらのグループは、疎水性の塩基対を数多く合成し、それらの塩基対のDNA中への取り込みを網羅的に調べた。

彼らの結果は疎水性の塩基同士が効率よく対合することを示しており、その一つの例がピロロピリジン（PP）とC3-メチルイソカルボステリル（MICS）の塩基対である（図1d）[Wu et al., 2000]。しかしながら、疎水性塩基はシェイプフィッティングとは関係なく対合する性質があり、PP同士やMICS同士の組み合わせでも効率よくDNA中に取り込まれてしまうという問題点がある。そして、Klenowフラグメントを用いた場合、シェイプフィッティングしていないこのような組み合わせの塩基を取り込んだ後では伸長反応がほとんど進行しない。

## 【0009】

最近、7-アザインドール（7AI）同士の自己相補塩基対（図1d）は、Klenowフラグメントと真核細胞由来のDNAポリメラーゼβを組み合わせて用いると伸長反応が進行することが示されたが[Tae et al., 2001]、現段階ではこの方法も実用化には至っていない。

## 【0010】

さらに、天然型塩基対と異なる水素結合様式をもち、かつ立体障害によって天然型塩基との対合を排除できるような塩基対を創出の研究が行われている。例えば、Ohtsuki et al., 2001及びHirao et al., 2002では、プリンの6位にかさ高い置換基を導入した2-アミノ-6-ジメチルアミノプリン（x）と2-アミノ-6-チエニルプリン（s）、そしてそのかさ高い置換基に相補する部位に水素原子をもったピリジン2-オノン（y）をデザインし、このx・y、s・y塩基対形成をKlenowフラグメントによるDNA中への取り込み効率により調べている（図2）。その結果、鋳型中のxに対するyの取り込みは低い選択性しか示さなかったが、sに対するyの取り込みは、比較的選択性も効率も良いことが示されている。

## 【0011】

上記s-y塩基対の開発によって、RNA中に選択的にyを導入することが可能になったので、yに機能性の置換基が結合した物質が得られれば、アプタマーやリボザイム等の新規機能性分子が創製可能になる。したがって、そのようなyの誘導体の創製が希望されている。

## 【0012】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチドを提供することを目的とする。

## 【0013】

本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドは、好ましくは前記塩基の5位が、以下の

1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基；

2) アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体；

3) ピオチン；あるいは

4) フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、テトラメチル-6-カルボキシローダミン、及びそれらの誘導体から選択される蛍光分子からなるグループから選択される置換基によって置換されている。5位の置換基は、最も好ましくはヨウ素である。

## 【0014】

本発明はまた、前記ヌクレオチドが組み込まれた核酸を提供することを目的とする。本発明の核酸は一態様において、前記ヌクレオチドと、6位置換された2-アミノープリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドとが塩基対を形成している。

## 【0015】

本発明はさらにまた、前記ヌクレオチドが組み込まれた核酸を調製する方法を提供することを目的とする。本発明の方法は、

6位置換された2-アミノープリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸を鑄型として転写、複製又は逆転写を行い、前記6位置換された2-アミノープリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドの相補的な位置に、前記5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドを組み込むことを含む。

## 【0016】

本発明はさらに、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸が、前記5位の置換基を介して共有結合している、核酸と1またはそれより多くの他分子(DNA、RNA、タンパク質等の生体分子がより好ましくは例示される)との多量体を提供することを目的とする。

## 【0017】

本発明はまた、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸を近接させて、前記5位の置換基を介して前記DNA同士、RNA同士、DNA／RNA、DNA／タンパク質又はRNA／タンパク質を共有結合させる、ことを含む、前記核酸と他分子(より好ましくは生体分子)との多量体の形成方法を提供することを目的とする。

## 【0018】

## 【課題を解決するための手段】

非天然型塩基対s・yを利用した場合には間違ったUの取り込みは無視できるほどの選択性を示し、mRNA中の特定の位置にyを導入して、s・y塩基対を新たなコドン・アンチコドン相互作用に利用できることが示された[Hirao et al., 2002]。本発明者らは、5位に置換基をもつy誘導体をRNA中に位置選択的に導入し、新たな機能をもつRNAの創製取り組み、本発明を想到した。

## 【0019】

5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチド

本発明は、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチドを提供する。本発明の5位置換ピリジン塩基を有するヌクレオシド又はヌクレオチドは、ピリジン塩基の1, 2又は6位に置換基を導入したヌクレオシド又はヌクレオチドと比較して、塩基間の不要な干渉(塩基対形成時の立体障害や不要な結合形成)が起こりにくいという利点を有する。

## 【0020】

本発明における「ヌクレオシド」とは、核酸塩基と糖の還元基とがグリコシド結合によって結合した配糖体化合物を意味する。なお、前記「核酸塩基」は、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、及びこれら塩基の誘導体も含む概念である。前記「誘導体」の種類は特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基に相当する塩基や、2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン-9-イル基に相当する塩基、などが挙げられる。「ヌクレオチド」は、前記ヌクレオシドの糖部分が、リン酸とエステルをつくっている化合物をいう。より好ましくは、1ないし3リン酸エステルである。ヌクレオシド又はヌクレオチドの糖部分はリボフラノシル、2'-デオキシリボフラノシル、あるいはハロゲンなどの置換基を2'位に有する2'-置換リボフラノシルであってもよく、また、リン酸部分は、チオリン酸であってもよい。つまり、糖部分およびリン酸部分は、公知のヌクレオシド、ヌクレオチド、あるいはこれらの誘導体にみられる構成をとっていればよい。糖部分がリボフラノシルであるリボヌクレオチドはRNAの構成成分となり、デオキシリボフラノシルであるデオキシリボヌクレオチドはDNAの構成成分となる。

## 【0021】

本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドは、好ましくは前記塩基の5位が、以下の

- 1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基；
- 2) アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体；
- 3) ピオチン；あるいは
- 4) フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、テトラメチル-6-カルボキシローダミン、及びそれらの誘導体から選択される蛍光分子からなるグループから選択される置換基によって置換されている。

## 【0022】

1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基は、光照射することによりラジカルを発生させ、隣接する分子を共有結合する。限定されるわけではないが、例えば、ヨウ素の場合(5-ヨードy)、好ましくは約318nmUVを約1時間照射する。

## 【0023】

限定されるわけではないが、5位の置換基は最も好ましくはヨウ素である。3-（ $\beta$ -D-リボフラノシル）-5-ヨードピリジン-2（1H）-オンの5'-三リン酸誘導体（5IyTP）の構造式は、図4a)に記載されている。

## 【0024】

2) 本発明のヌクレオシド又はヌクレオチド中の塩基は、5位の置換基として、アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体を有することも可能である。

## 【0025】

アルケニル、アルキニル、アミノ基、又はその誘導体は、他分子と疎水的あるいは親水的な相互作用に役立ち、例えば、アプタマーとそのターゲットとなる分子との間の相互作用を強めることができる。また、リボザイムの場合には、新たな活性部位を創製することが出来る。さらに、アミノ基の誘導体は、このものからビオチンや蛍光色素の結合した誘導体の合成中間体にもなる。

## 【0026】

アルケニル基又はアルキニル基は、好ましくは、炭素数2ないし5、より好ましくは、炭素数2ないし3である。誘導体としては、例えば、 $-C\equiv C C_6H_5$ 、 $-C\equiv C C_2H_2N H_2$ 、 $-CH=CH-C_2H_2-NH_2$ が含まれる。好ましくは、 $-C\equiv C C_6H_5$ （2-フェニルエチニル基）である。

## 【0027】

3) ビオチンは補酵素Rとも呼ばれ、ビタミンB群の1種である。ビオチンは、卵白中の含まれる糖タンパク質であるアビジンと特異的に結合し、複合体を形成することが知られている。よって、5位の置換基としてビオチンを有する本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドは、アビジンタンパク質に特異的に結合する。

## 【0028】

4) 5位置換基として、フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、テトラメチル-6-カルボキシローダミン、及びそれらの誘導体から選択される蛍光分子を有する場合、蛍光分子の種類に応じて、本発明のヌクレオチドを含む核

酸の検出を行うことが可能である。よって、5位に蛍光分子を有する本発明のヌクレオチドを含む核酸は、標識核酸として当該核酸と相互作用する物質検出のプローブとして使用される。

## 【0029】

限定されるわけではないが、例えば、フルオレセインの吸収極大波長は513 nm、蛍光極大波長は532 nmである。また、6-カルボキシフルオレセインの吸収極大波長は495 nm、蛍光極大波長は521 nm、テトラメチル-6-カルボキシローダミンの吸収極大波長は555 nm、蛍光極大波長は580 nmである。それぞれの物質によって蛍光色が異なるため、多重染色に使用することも可能である。

## 【0030】

本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチドの合成法は、特に限定されることなく、置換基の種類に応じて合成することができる。例えば、本明細書の実施例1に記載したように、3-( $\beta$ -D-リボフラノシリル)-ピリジン-2(1H)-オンに、先ず5位に置換基を導入し、次いで、3リン酸を導入してもよい。あるいは、3-( $\beta$ -D-リボフラノシリル)-ピリジン-2(1H)-オンに、先ず3リン酸を導入し、次いで、置換基を導入してもよい。また、2)アルケニル、アルキニル、アミノ基、又はその誘導体のような大きな基を導入する場合、先ず、ヨード等の光反応性基を導入して活性化してから、置換してもよい。また、置換基を導入する際の反応条件などは、ピリジンにこれら置換基を導入する反応の場合を参照して行うことができる。

## 【0031】

本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドが組み込まれた核酸

本発明は、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドが組み込まれた核酸を提供する。本発明の核酸は、一本鎖又は二本鎖のRNA又はDNAを含む。二本鎖は、DNA/DNA、RNA/RNA、又はDNA/RNAであってもよい。また、DNAには、RNAを鑄型として逆転写してなるcDNAも含まれる。あるいは、核酸は3本鎖、4本鎖等も

形成しうる。

## 【0032】

本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドは、6位置換された2-アミノ-プリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチドとが塩基対を形成することが可能である。図2c)に示されたyとs(2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン-9-イル基)と同様に、本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基は、6位置換された2-アミノ-プリン-9-イル基と、2箇所で水素結合を生じる。6位置換された2-アミノ-プリン-9-イル基は、好ましくは2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン-9-イル基(s)又は2-アミノ-6-(ジメチルアミノ)プリン-9-イル基(x)である。より好ましくは、2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン-9-イル基(s)である。

## 【0033】

本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基は、立体構造上、天然型プリン塩基A(アデニン)及びG(グアニン)とは塩基対を形成できない。そして、6位置換された2-アミノ-プリン-9-イル基は立体障害のため、天然型T(チミン)、U(ウラシル)及びC(シトシン)とは塩基対を形成できない。よって、本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基は、6位置換された2-アミノ-プリン-9-イル基と特異的に塩基対を形成することが可能である。

## 【0034】

よって、本発明の核酸は、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドと、6位置換された2-アミノ-プリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドとが塩基対を形成している、態様を含む。6位置換された2-アミノ-プリン-9-イル基は、好ましくは、2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン-9-イル基又は2-アミノ-6-(ジメチルアミノ)プリン-9-イル基である。

## 【0035】

本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として

有するヌクレオチドは、転写、複製又は逆転写反応により、DNA又はRNA等の核酸に取り込むことが可能である。

## 【0036】

限定されるわけではないが、本発明のヌクレオチドが組み込まれた核酸は、6位置換された2-アミノープリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸を錠型として転写、複製又は逆転写を行い、前記6位置換された2-アミノープリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドの相補的な位置に、本発明の核酸を組み込む

ことを含む、方法によって調製することが可能である。あるいは、天然型塩基を有するヌクレオシド又はヌクレオチドと同様に、化学合成によってDNA又はRNAに取り込んでもよい。

## 【0037】

例えば、5位にヨウ素原子をもつウリジン(U)誘導体、5-ヨードU(5IU)を転写反応によりRNA中に導入する場合には、UTPと5IUUTPの存在比を変えて転写反応を行い、Uの位置をランダムに5IUで置換するか、あるいはUTPの代わりに5IUUTPだけを転写反応に用いてUの位置を全て5IUに置換するしかない。この場合、5IUの導入によってRNAの高次構造が変化してしまったり、RNAの機能に支障をきたすこともある[Jensen et al., 1995]。これに対し、本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基は、6位置換された2-アミノープリン-9-イル基と特異的に塩基対を形成する。よって、所望の位置に6位置換-2-アミノープリン-9-イル基が導入されているDNA又はRNAを錠型として、転写、複製又は逆転写反応を行うことにより、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチドを位置選択的に導入することが可能となった。

## 【0038】

転写、複製又は逆転写反応は公知の方法に従って行うことが可能である。限定されるわけではないが、例えば、転写反応はT7 RNAポリメラーゼ(Takara等)、複製反応は、クレノウフラグメント(KF)、逆転写反応はのAM

V Reverse Transcriptase XL (AMV-RT) (Life Science社) を使用することが可能である。複製反応は、反応中に6位置換された2-アミノープリン-9-イル基が除去されてしまうのを防ぐために、例えば、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性をもたないTaq DNAポリメラーゼ (Takara Taq<sup>TM</sup>) を用いてsを含むプライマーによる鑄型DNAのPCR増幅も可能である。

## 【0039】

なお、6位置換された2-アミノープリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドは、公知の方法、例えば、[Fujiwara et al., 2001]に記載の方法で合成可能である。

## 【0040】

本発明の、ヌクレオチドが組み込まれた核酸は、アンチセンスDNA若しくはRNA、リボザイム又はアプタマーとして使用されうる。アンチセンスDNA若しくはRNAとは、ある特定の遺伝子の発現を抑えるDNA又はRNAである。標的とする遺伝子配列（センス鎖）の全長又は部分配列に対して相補的という意味で名付けられた。人為的に遺伝子発現を調節する手法として使用されうる。本発明のヌクレオチドが組み込まれたアンチセンスDNA又はRNAは、非天然型塩基を含むため標的に対する相補性が天然型塩基のみを使用した場合と比較して異なるものを創製しうる。リボザイムは、RNAを構成成分とする触媒の総称であり、広義のアンチセンスRNAに含まれる。アプタマーは、in vitroセレクション法によって得られた、特定の分子に結合する機能を有する核酸である。

## 【0041】

例えば、in vitroセレクションによって得られる5位置換された2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を含むアプタマーは、標的タンパク質と架橋反応する等の新機能を持つRNA分子を創製することも可能となる。

## 【0042】

まず、例えばsを含むプライマーを用いて鑄型DNAプールをPCRにより増幅し、これを転写して3'末端側の特定部位に5Iyを含むRNAプールを調製

する。このRNAプールから、光架橋反応を指標にして *in vitro* セレクションを行い、特定のアプタマーを得ることができる。また、5'端はRNAアプタマー中の3'側に位置しているので、セレクションにおける逆転写反応の効率に悪影響を及ぼすことも少ない。さらに、疎水的な置換基を導入して、ターゲットとする物質とアプタマーとの疎水-疎水結合を強めるセレクションも可能である。

## 【0043】

また、5位の置換基としてビオチンを導入した核酸分子の調製も、転写反応で可能である。これは、アビジンとの相互作用を利用した例えばRNAの固相化や、多量体化に適用可能である。さらに、蛍光分子をRNAアプタマー中に導入してアナライト (analyte) として活用する例も報告されている [Jhaveri et al., 2000; Yamamoto et al., 2000; Fang et al., 2001]。

## 【0044】

これまでに、修飾塩基のヌクレオシドフルオレセイン-1'2'-ウラシル (F-1'2'-U) [Jhaveri et al., 2000]、5-(1-ペンチニル)ウラシル [Latham et al., 1994]、5-(3','-アミノプロピニル)ウラシル [Battersby et al., 1999]、5-ヨードウラシル (5IU) [Jensen et al., 1995]、5-ブロモウラシル (5BrU) [Golden, et al., 2000] を *in vitro* セレクションで利用した例が報告されている。しかしながら、これらの例では全て、DNAもしくはRNAプールの調製の段階から修飾塩基を天然型塩基 (TもしくはU) と置換している。本発明では、5位置換-2'-オキソ (1H)-ピリジン-3-イル基の、6位置換された2'-アミノ-プリン-9-イル基との特異的な塩基対を利用して、転写反応の1段階で位置選択的に本発明のヌクレオチドをRNAに取り込むことが可能になった。本発明の非天然型の塩基を含む5種類の塩基からなるRNAを任意に調製出来れば、その有用性・汎用性は非常に高い。

## 【0045】

また、本発明の、ヌクレオチドが組み込まれたDNA又はRNAは、タンパク質、ペプチドの全体又は一部をコードするものであってもよい。

本発明のヌクレオチドを含む核酸と他分子（核酸、タンパク質等）含む多量体

本発明はさらに、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸が、前記5位の置換基を介して共有結合している、核酸と1またはそれより多くの他分子(DNA、RNA、タンパク質等の生体分子がより好ましくは例示される)との多量体を提供することを目的とする。

【0046】

本発明はまた、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸を近接させて、前記5位の置換基を介して前記DNA同士、RNA同士、DNA／RNA、DNA／タンパク質又はRNA／タンパク質を共有結合させる、ことを含む、前記核酸と他分子（より好ましくは生体分子）との多量体の形成方法を提供することを目的とする。

【0047】

上述したように、本発明のヌクレオシド又はヌクレオチド中の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基において、5位の置換基の種類によっては、近接する他分子と共有結合を結合しうる。

【0048】

例えば、具体的には、5位置換基が1)ヨウ素、臭素から選択される光反応性基の場合、反応基の種類に応じた適当な波長の光照射を行うことにより、近接する他分子と共有結合を形成する。例えば、本明細書中の実施例で、参考例1で得られたanti-(Raf-1)アプタマー(RNA 9A)に5Iyを位置選択的に導入して、ターゲットタンパク質(Raf-1 RBD)の存在下で架橋反応を行い、本発明の非天然型塩基の有用性を調べた。RNA 9A中の5Iyの導入部位として、RNAの高次構造の変化やピリミジンダイマー等の形成を出来る限り避けるため、RBDとの相互作用に重要でないとわかっている3'末端側の領域のうち、プリン塩基に挟まれたC84、C87、A92を選んだ。そして、それぞれの位置に5Iyが選択的に導入された各RNAとN末端にGST(

グルタチオントランスフェラーゼ)を融合させたRaf-1 RBD (GST-RBD)の存在下で光照射による架橋反応を行った。その結果、84又は87残基に5-Iyを含むRNAは、架橋反応によりRNA同士の二量体を形成することがわかった。GSTタンパク質は溶液中で二量体を形成することから、GST-RBDも溶液中で二量体を形成し、RNA 9AがRaf-1 RBDに結合して5-Iyを含む配列部分が近接したときに、RNA分子間の架橋反応が進行したと考えられる。この結果は、5-IyがRNA間相互作用の解析に利用できることを示している。本発明において、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有する核酸と他分子が近接するとは、5位の置換基と他分子が共有結合を形成しうるくらい、物理的に近位に配置されることを意味する。

## 【0049】

本発明では5位の置換基間で水素結合等よりも強い共有結合が形成され架橋されるため、分離、精製等が可能であり、核酸と他分子の相互作用をより直接的に調べることが可能となった。架橋反応産物の解析は公知の方法、例えばゲルシフトアッセイ、クロマトグラフ、マススペクトル等によって行うことが可能である。なお、本発明の核酸と他分子は二量体のみならず、3又はそれより多くの多量体を形成することも可能である。

## 【0050】

あるいは、本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するDNA又はRNAが結合しているタンパク質間相互作用を観察することも可能である。例えば、本明細書中の実施例では、Raf-1 RBDに結合するRNAアプタマーであるRNA 9Aについて、本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドを位置選択的に導入すると、RNA分子間の二量体化が観察された。これは、実施例で使用したGST-RBDが溶液中で二量体を形成し、RBD部分に結合したRNA 9Aが近接したときにRNA分子間の架橋反応が進行したためと考えられる。GSTタンパク質は二量体を形成しやすく、実際にタンパク質を二量体化させるドメインとして利用されている。よって、本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するDNA又はRNAの架橋反応を利用して、架橋反応物の解析を行えば、当該DNA又

はRNAが結合しているタンパク質同士の相互作用の解析も可能である。

【0051】

あるいは核酸分子とタンパク質間の相互作用を強固にして、アプタマーによるターゲットタンパク質の活性の阻害や核酸・タンパク質の相互作用の解析などに有用な手法を提供することになる。例えば、ターゲットタンパク質の活性を阻害する既存のアプタマーは、共有結合でターゲットタンパク質と結合しているわけではないので、そのタンパク質の活性を完全に阻害することはできない。しかし、5Iyを含むアプタマーを用いて、光照射によりターゲットタンパク質にアプタマーを共有結合させることにより、そのタンパク質の活性を完全に阻害することも可能である。

【0052】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

【0053】

実施例1 3-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステルの合成

(1) 3-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オンの合成(図3の1→2)

3-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-ピリジン-2(1H)-オン 342 mg (1.5 mmol) (Matulic-Adamic, J., Beigelman, L., Tetrahedron Lett., 1997, 38, p. 203-206. ; Ishikawa, M., Hirao, I., Yokoyama, S., Tetrahedron Lett., 2000, 41, p. 3931-3934)、ヨウ素 573 mg (2.3 mmol)、ヨウ化カリウム (KI) 657 mg (7.9 mmol) を、50 mM炭酸ナトリウム 36 ml に加え、110°Cで12時間加熱した。反応後にジクロロメタンを加え、水層を

分離し、ジクロロメタンで洗浄した。水層を減圧濃縮後C18逆相HPLCで精製し、3-( $\beta$ -D-リボフラノシリル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 155mgを得た。

## 【0054】

(2) 3-( $\beta$ -D-リボフラノシリル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 5' -三リン酸エステルの合成(図3の2→4)

上記(1)の3-( $\beta$ -D-リボフラノシリル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 0.1mmol、プロトンスポンジ48mg(0.23mmol)をトリメチルホスフェート500 $\mu$ lに溶解し、0℃に冷却した。オキシ塩化リン( $\text{POCl}_3$ )13 $\mu$ l(1.3当量)を加え、0℃で4-5時間攪拌した。トリ-n-ブチルアミン119 $\mu$ l(5.0当量)、次いで0.5 $\mu$ Mピストリブチルアンモニウムピロホスフェート(ジメチルホルムアミド溶液)1.0ml(5.0当量)(Ludwig. J., Eckstein, F., J. Org. Chem., 1989, 54, p. 631-635)を加える。30分後0.5Mトリエチルアンモニウムピカーボネット500 $\mu$ lを攪拌する。反応液をDEAEセファデックスA-25、次いで、C18逆相HPLCで精製し、標題化合物3-( $\beta$ -D-リボフラノシリル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 5' -三リン酸エステル(本明細書において、場合により「5IyTP」と呼称する)を得た。

## 【0055】

## ESI-Mass

計算値: 593.05、実測値: 591.70 (M-H)

実施例2 3-( $\beta$ -D-リボフラノシリル)-5-(2-フェニルエチニル)-ピリジン-2(1H)-オン 5' -三リン酸エステルの合成

(1) 3-( $\beta$ -D-リボフラノシリル)-5-(2-フェニルエチニル)-ピリジン-2(1H)-オンの合成(図3の2→3)

実施例1 (1)の3-( $\beta$ -D-リボフラノシリル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 71mg(0.20mmol)をDMF 1.0mlに溶解した。次いで、CuI 6mg(0.032mmol)、トリエチルアミン42 $\mu$ l(0

30 mmol)、フェニルアセチレン33  $\mu$ l (0.30 mmol) 及びPd( $\text{Ph}_3\text{P}$ )<sub>4</sub> 11 mg (0.010 mol) を加え、アルゴン雰囲気下、室温で6時間攪拌した。酢酸エチル10 mlを加えた後、水10 mlづつで3回抽出した。水層を合わせ、減圧下で濃縮した。逆相HPLCで精製し、白色の3-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-5-(2-フェニルエチニル)-ピリジン-2 (1H)-オン60 mg (92%)を得た。

## 【0056】

## 【化1】

<sup>1</sup>H-NMR (270.16 MHz、メタノール-d<sub>4</sub>) ;  $\delta$  7.86 (dd, 1H, J=0.8, 2.4 Hz, 6), 7.62 (dd, 1H, J=0.3, 2.4 Hz, 4), 7.46 (m, 2H, フェニル), 7.35 (m, 3H, フェニル), 4.85 (d, 1H, J=4.9 Hz, 1'), 4.12 (t, 1H, J=4.9 Hz, 3'), 4.00-4.07 (m, 2H, 2', 4'), 3.84 (dd, 1H, J=2.7, 12.2 Hz, 5'), 3.70 (dd, 1H, J=3.8, 12.2 Hz, 5')。ESI-MS (negative) ; 325.85 [M-H]。 $\lambda_{\text{max}} = 287 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 7.7 \times 10^3$ )

(2) 3-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-5-(2-フェニルエチニル)-ピリジン-2 (1H)-オン 5' -三リン酸エステルの合成 (図3の3→5)

上記(1)の5-(2-フェニルエチニル)-3-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-ピリジン-2 (1H)-オン14 mg (0.043 mmol) および1,8-ビス(ジメチルアミノ)ナフタレン14 mg (0.068 mmol) を、トリメチルホスフェート0.43 mlに溶解した。氷冷下オキシ塩化りん5.2  $\mu$ l (0.056 mmol) を加え、0°Cで2時間攪拌した。トリブチルアミン5.2  $\mu$ l 及び0.5Mビストリブチルアンモニウムピロホスフェート(ジメチルホルムアミド溶液)0.43 mlの混合液を加え、0°Cで10分間攪拌した。TEA B 5 ml (50 mmol) を加え、4°Cで、DEAEセファデックス陰イオン交換カラムで0.05-1MグラディエントTEA Bで精製した。標題化合物3-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-5-(2-フェニルエチニル)-ピリジン-2 (1H)-オン 5' -三リン酸エステルを含む画分を凍結乾燥し、27 mg (6

5%) の目的化合物を得た。最終物をさらに逆相HPLCで精製した。

【0057】

ESI-MS (negative) ; 565.58 [M-H]

実施例3 非天然型塩基を含むヌクレオシド三リン酸の濃度およびモル吸光係数の決定

本願発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチド等の、非天然型塩基を含む各ヌクレオチド(dNTP/NTP)の濃度は、アルカリリフォスファターゼによりリン酸エステル結合を分解後、無機リン酸の含有量を求ることで決定した。また、各ヌクレオシド三リン酸のモル吸光係数イプシロン(ε)の値は、10mM リン酸緩衝液(pH7)中での極大吸収波長および波長260nmにおける吸光度Abs(Absorbance)を測定して、計算式  $\epsilon = \text{Abs} / \text{Conc}$  (Conc: dNTP/NTP濃度)からεを決定した。

【0058】

実施例1で作成した5IyTPのUV吸収について図4に示した。5IyTPは、吸収極大波長が318nm付近である。

アルカリリフォスファターゼによるリン酸エステル結合の分解反応は、ヌクレオシド5'-三リン酸、50mM Tris-HCl pH9.0、1mM MgCl<sub>2</sub>、20単位のウシの腸由来のアルカリリフォスファターゼ(Takara)を含む反応溶液(40μlスケール)を42°Cで1時間インキュベートすることにより行った。リンの定量は、Chenの方法に従って行った [Chen et al., 1956]。反応溶液の半量20μlを4mlの水と4mlの試薬C(6N硫酸、蒸留水、2.5%モリブデン酸アンモニウム溶液、10%L-(+)-アスコルビンを体積比1:2:1:1で混合した溶液)に加えて、37°Cで2時間振盪しながら反応させた、反応後のサンプルを室温に戻してから20nmの吸光度を測定して、検量線からリンの含有量を算出した。

【0059】

実施例4 RNA9Aに5IyTPを位置選択的に導入するための錆型DNAの調製

上述した2-アミノ-6-チエニルプリン(s)、そしてそのかさ高い置換基に相補する部位に水素原子をもったピリジン-2-オン(y)からなるs・y塩基対はPCRによるDNAの増幅に耐えられるほどの選択性がない。しかしながら、sを含むプライマーを用いたPCRで鑄型DNAを増幅することができる。そこで、参考例1で得られたRNA 9A(全長100ヌクレオチド)中のRa f-1 RBDとの相互作用に重要でないとわかっている3'末端側の領域のうち、プリン塩基に挟まれたC84、C87、A92を5Iyの導入部位として選んだ。

## 【0060】

具体的には、先ずPCR反応の鑄型には、参考例1で得られたベクターTOP O-9A(アプタマーRNA 9Aがサブクローニングされたベクター)をBamHIで1箇所切断して直鎖状にした二本鎖DNA(dsDNA)を用いた。RNA 9Aは、本明細書中の配列番号1及び図5b)に示した100塩基からなる配列を有する。図5b)中下線で示した、84、87及び92は、5Iyを導入する部分である。PCR用のプライマーとしては、配列番号2の塩基配列からなるセンスプライマー及び配列番号3-7のいずれかの塩基配列からなるアンチセンスプライマーを用いた。

## 【0061】

## 【化2】

## センスプライマー

ggtaatacga ctcactatag ggagtggagg aattcatcg	39	(配列番号2)
--	----	---------

## アンチセンスプライマー

gcagaaggctt gctgtcgcta aggcatatg	29	(配列番号3)
----------------------------------	----	---------

gcagaaggctt gctgt <u>c</u> scta aggcatatg	29	(配列番号4)
---	----	---------

gcagaaggctt g <u>c</u> tstcgcta aggcatatg	29	(配列番号5)
---	----	---------

gcagaag <u>c</u> st gctgtcgcta aggcatatg	29	(配列番号6)
--	----	---------

gcagaag <u>c</u> st gctgt <u>c</u> scta aggcatatg	29	(配列番号7)
---	----	---------

センスプライマー(配列番号2)の塩基19-39は、RNA 9A(配列番号

1) の塩基1-20に相当する。配列番号2の3-18は、T7プロモーターに相補的な配列を含む。

## 【0062】

3' 末端側のアンチセンスプライマーとして、RNA 9A (配列番号1) の固定領域 (72-100) に相補的な配列をもつ29.45sを1箇所だけ含む29.45s84、29.45s87、29.45s92、sを2箇所含むプライマー29.45s84/92を化学合成した。(図5b)、これらのプライマーを用いた以下のPCRによりsを含む錆型DNAを増幅した。

## 【0063】

なお、プライマーに使用される2-アミノ-6-チエニルプリン(s)のフォスフォアミダイトは、公知の方法、例えば、[Fujiwara et al. , 2001]に記載の方法で合成可能である。

## 【0064】

PCR反応は、PCR中にsが除去されてしまうことを防ぐため、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性がないTaq DNAポリメラーゼ(Takara Taq<sup>TM</sup>)を用いて行った。反応組成は、10mM Tris-HCl pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTPs、1μMの各プライマー、1ng/μl 錆型 dsDNA、0.025U/μl Taq DNAポリメラーゼである。反応はPTC-100<sup>TM</sup> Program Thermal Controllerを用いて[94(C、30秒)-40(C、30秒-60(C、1分)]×15もしくは20サイクル、60(C 5分の条件で行われた。

## 【0065】

反応溶液をフェノールクロロホルム抽出した後、上清をエタノール沈殿してPCR産物を回収した。sがプライマー中で比較的3'末端側に位置する29.45s84および29.45s84/92を用いた場合、PCRの増幅効率が若干低下したが、転写反応に十分な純度のPCR産物を得ることができた(図省略)。PCR産物を10mM NaClを含む10mM Tris-HCl (pH 7.6)に溶かして保存し、以降のT7転写反応の錆型とした。

## 【0066】

実施例5 T7 RNAポリメラーゼによる転写反応

本実施例では、実施例4で得られたPCR産物を鑄型とし、T7 RNAポリメラーゼによる転写反応によって、実施例1で作成した5Iyを3'末端側の特定の位置に導入した種々のRNA 9A変異体を作成した。

## 【0067】

T7転写反応の組成はOhtsuki et al., 2001に記載されたものと同様である。具体的には、40mM Tris-HCl pH8.0、5mM DTT、24mM MgCl<sub>2</sub>、2mMスペルミジン、0.01% Triton X-100、10mM GMP、1mM NTPs、0-0.25mM 5IyTP、0.2μl/μl鑄型DNA、2.5U/μl T7 RNAポリメラーゼ(Takara)である。37°Cで6時間酵素反応を行い、反応産物を8%ポリアクリルアミド-7M尿素ゲルで電気泳動して精製した。

## 【0068】

図6a)は、0.25mMの5Iyが存在下(+)又は非存在下(-)で転写反応を行い、その反応産物を電気泳動した場合のオートラジオグラムを示す。図6b)は、RNA 9Aの2次構造上に、5Iyが導入される箇所を黒丸で示したものである。図6に示されたように、0.25mMの5Iyリボヌクレオシド三リン酸(5IyTP)の存在下、効率よく転写反応が進行し、全長100ヌクレオチドの産物をゲル電気泳動により確認できた。

## 【0069】

なお、5IyTPの代わりに実施例2で作成した3-(β-D-リボフラノシリ)-5-(2-フェニルエチニル)-ピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステルを用いた場合にも、同様に転写反応が行われることが確認された。

## 【0070】

実施例7 転写反応産物の塩基組成分析

実施例6で得られた全長の反応産物中に5Iyがどれだけ選択的に導入されているかを調べるため、RNAの塩基組成分析を行った。[α-<sup>32</sup>P]ATPもし

くは  $[\alpha-^{32}\text{P}]$  GTP 存在下で T7 転写反応を行った場合、A もしくは G の 5' 側に隣接するヌクレオシド 3' - リン酸 (Np) がそれぞれ  $^{32}\text{P}$  で標識される。したがって、ゲルから精製された RNA を RNase T<sub>2</sub> (Sigma) を用いて Np に完全分解した。84、92 残基の位置に 5Iy が導入されていれば 5Iy のヌクレオシド 3' - リン酸 (5IyTp) が  $[\alpha-^{32}\text{P}]$  GTP により  $^{32}\text{P}$  で標識され、87 残基の位置であれば  $[\alpha-^{32}\text{P}]$  ATP により標識される (図 5、図 6-b)。完全分解された産物を 2D-TLC で分離してそれぞれのヌクレオチドを定量した 5Iy を含む RNA の塩基組成分析を行った。

## 【0071】

具体的には、RNA の完全分解では、ラベルされた RNA と 0.25 OD の E. coli 由来 tRNA 混合物 (Sigma) を含む水溶液 4.25  $\mu\text{l}$  に 0.75  $\mu\text{l}$  の RNase T<sub>2</sub> 溶液 (5 単位/ $\mu\text{l}$  ; 100 mM NaOAc pH 4.5、10% グリセロール) を加えて、37°C で一晩酵素反応を行った。反応溶液の一部を 10 cm × 10 cm の TLC 板 (フナセル SF ; フナコシ) にスポットして二次元に展開した。一次元目および二次元目の展開液の組成は、イソ酪酸 66 : アンモニア 1 : 水 33 (体積比)、および 2-プロパノール 70 : 塩酸 15 : 水 15 (体積比) である。展開後のスポットをバイオイメージング アナライザー (BAS 2500、富士フィルム) で検出して、それぞれ定量した。

## 【0072】

結果を図 7 及び表 1 に示す。

## 【0073】

【表1】

RNA	<sup>32</sup> P label	SlyTP	Ap	Gp	Cp	Up	Slyp	misincorporation*
9A	ATP	-	5.91(6)	5.97(6)	7.02(7)	6.11(6)		
	ATP	+	5.92(6)	6.01(6)	6.95(7)	6.10(6)	0.10(0)	0.45%
	GTP	-	7.84(8)	4.91(5)	4.19(4)	5.06(5)		
	GTP	+	7.77(8)	5.03(5)	4.18(4)	4.93(5)	0.09(0)	0.41%
9A(Sly84)	ATP	+	5.91(6)	5.99(6)	7.02(7)	5.97(6)	0.12(0)	0.41%
	GTP	+	7.81(8)	5.00(5)	3.10(3)	5.13(5)	0.97(1)	
9A(Sly87)	ATP	+	5.86(6)	5.98(6)	6.11(6)	6.03(6)	1.04(1)	
	GTP	+	7.93(8)	5.03(5)	4.04(4)	4.94(5)	0.06(0)	0.27%
A(Sly92)	ATP	+	4.89(5)	5.94(6)	7.09(7)	5.97(6)	0.11(0)	0.46%
	GTP	+	6.90(7)	5.02(5)	4.23(4)	4.86(5)	0.98(1)	
9A(Sly84/92)	ATP	+	5.09(5)	5.74(6)	7.07(7)	5.98(6)	0.12(0)	0.5%
	GTP	+	6.94(7)	4.98(5)	3.16(3)	4.92(5)	2.00(2)	

表1. 転写反応産物の塩基組成分析

各数値は以下の式により算出された。かっこ内は理論上のヌクレオチドの数を示す。

【0074】

【化3】

[各ヌクレオチド(Np)の<sup>32</sup>Pのカウント] × [AもしくはG\*\*の5'末端のヌクレオチドの総数]  
[全ヌクレオチドの<sup>32</sup>Pのカウント]

\* [5' I y p の数値] / [AもしくはG\*\*の5'末端のヌクレオチドの総数] × 100 (%)。

\*\* Gの場合は、p G p のカウントを除いて計算した。

その結果、鑄型中のsに対して5' I y が高い選択性で取り込まれ(97%以上)、誤った5' I y の取り込みは全体の僅か0.5%以下であった。以上より、sを含むプライマーを用いてプラスミド中の配列からPCRで鑄型を調製することにより、5' I y をRNA中に位置選択性で導入できることがわかった。

【0075】

実施例8 5' I y が導入された各RNAのRaf-1 RBDへの結合効率

本実施例では、5' I y が位置選択性で導入された各RNAのRaf-1 RBDに対する結合活性の変化を調べるために、フィルター結合法により結合効率を求めた(表2)。1箇所に5' I y が導入された9A(5' I y 84)、9A(5' I y 87)、9A(5' I y 92)は5' I y を含まないRNA 9Aと同程度の結合

効率を示した。2箇所に5Iyが導入された9A (5Iy84/92) では結合効率が低下した。一方、5-ヨードU (5IU) が1分子あたり平均5~6塩基分ランダムに導入されたRNA 9A (5IU) でも結合能が落ちた。以上の結果から、少なくとも5IyをRNA 9Aの84、87、92残基の1箇所にのみ導入した場合はアプタマーの結合活性に与える影響がほとんどなく、位置選択的に5Iyを導入できる本手法が有益であることがわかった。

## 【0076】

【表2】

RNA	Raf-1 RBD binding %	Filter binding %
9A	25 (5)	0.2 (0.1)
9A(5IU) <sup>a</sup>	16 (3)	0.3 (0.2)
9A(5Iy) <sup>b</sup>	24 (2)	0.08 (0.03)
9A(5Iy84)	21 (5)	0.1 (0.1)
9A(5Iy87)	22 (2)	0.06 (0.04)
9A(5Iy92)	25 (2)	0.1 (0.1)
9A(5Iy84/92)	15 (2)	0.2 (0.1)

表2 5Iyが導入された各RNAのRaf-1 RBDへの結合効率

各RNAのRaf-1 RBDへの結合効率をフィルター結合法により求めた (Raf-1 RBD/ RNA = 300 : 5 nM)。実験は3回行い、その平均値を示した。かっこ内の数値は標準偏差。<sup>a</sup>0.4 mMの5IUTP存在下、sを含まない酵型DNAから転写されたRNA 9A。<sup>b</sup>0.25 mMの5IyTP存在下、sを含まない酵型DNAから転写されたRNA 9A。

## 【0077】

実施例9 UV照射による架橋反応

本実施例では、5Iyを位置選択的に含む各RNAを用いて、光照射による架橋反応性を調べた。

## 【0078】

先ず、5'末端が<sup>32</sup>Pで標識されたRNAを緩衝液A中で75°Cで3分加温した後に室温で10分以上放置して、RNAの二次構造を形成させた。一方、Raf-1 RBDは、ヒト Raf-1のRBD (アミノ酸残基51-131番

) をGST (グルタチオントランスフェラーゼ) 融合タンパク質として大腸菌内で発現し、菌体を破碎後の上清からカラムクロマトグラフィーで精製した。rat RGLのRBD (アミノ酸残基632-734番) [Koyama et al., 1996] およびhuman B-RafのRBD (アミノ酸残基149-226番) もGST融合タンパク質として大腸菌内で発現し、同様に精製した。

## 【0079】

二次構造を形成させたRNAの溶液に等容量のRaf-1 GST-RBD溶液 (RBDの他、BSA 160 μg/ml、1 mM DTT、7.3%グリセロールを緩衝液Aに溶かしたもの) を加えて37°Cで30分間インキュベーションしてRNA・RBDの複合体を形成させた。そして、氷上にセットした96穴のマルチウェルプレート (COASTAR社) のウェルにそのサンプルを40-120 μlずつ分注した。300 nm以下の波長のUVを減少させるためにポリスチレンの蓋をしてからUVトランスイルミネーター (TVC-312R/J Spectronics社、UV波長312 nm) を用いて約1 cmの距離からUVを1時間照射した。

## 【0080】

光源に用いたUVの波長は、5IyTPの吸収極大波長が318 nm付近であることを考慮して選択された (図4)。一方、UVトランスイルミネーターを用いた場合には、照射波長が270-400 nmと広がってしまう (8/15 W medium wave UV-B fluorescent tubeのスペクトル表より。図省略) [Meisenheimer & Koch, 1997]。そこで本実施例では、天然型塩基の吸収波長と重なる300 nm以下の光を出来る限り減少させるため、サンプルにポリスチレン製の蓋をしてUVを照射した。

## 【0081】

反応溶液を8%ポリアクリルアミド-7M尿素ゲルで電気泳動して、生成物を解析した。また、架橋反応産物を回収する際には、反応溶液をフェノール・クロロホルム抽出した後、電気泳動で分離してゲルから抽出した。その結果、84又は

87残基に5Iyを含むRNA 9A (5Iy84) と9A (5Iy87) において、未反応のRNA (100ヌクレオチド) と異なる位置に、架橋反応産物のバンドがはっきり検出された (図8 レーン6及び8)。

## 【0082】

架橋反応産物が何であるかを同定することにした。RNA 9AはRaf-1 RBDに結合するアブタマーなのでRNAとGST-RBD間の架橋反応が一つの反応機構として考えられる。GST-RBD非存在下でUVを照射したところ、架橋反応産物のバンドが僅かではあるが検出された (図9 レーン1及び5)。そこで、GST-RBD存在下でUVを照射した後にproteinase K処理 (PK) やフェノール・クロロホルム抽出 (phenol) によってタンパク質を除去してみたが、そのバンドに変化はなかった (図9 レーン2-4, 及び6-8)。

## 【0083】

以上の結果から、架橋反応産物はRNA・タンパク質 (GST-RBD) 間の架橋反応に由来するものではないことがわかった。そして、RNAだけで架橋反応産物が検出されることと、架橋反応産物のバンドの移動度がほぼRNA 9A二量体分に相当すること (図省略) から、GST-RBD存在下でRNAが二量化したものが架橋反応より得られたと考えられる。そして、タンパク質共存下で、このアブタマーの2量化が促進されることもわかった。

## 【0084】

実施例10 RNA 9Aの架橋反応による2量体化

GSTタンパク質は二量体を形成しやすく、実際にタンパク質を二量体化させるドメインとして利用されている [Inouye et al., 2000]。したがって、本実施例で用いたGST-RBDも溶液中で二量体を形成し、RBD部分に結合したRNA 9Aが近接したときにRNA分子間の架橋反応が進行したと考えられる。その場合には、架橋反応産物はRaf-1 RBDとの結合活性も保持したままである可能性がある。

## 【0085】

そこで、9A (5Iy87) とRaf-1 RBDを等濃度0.1μMで混合

させた条件で架橋反応させた産物 (XL) をゲルから精製して、XLとGST-RBDとの結合をゲルシフトアッセイにより調べた。また、RNA 9Aの二量体のコントロールとして、RNA 9Aをタンデムに連結させたRNA 9A×2(全長200ヌクレオチド)も新たに調製し、ゲルシフトアッセイを行った。RNA 9A×2は、RNA 9Aの必須領域(1-80残基部分)を分子内に2つもつ全長200ヌクレオチドのRNAであり、T7 RNAポリメラーゼ(E. coli centre)を用いた転写反応により調製し、ベクター-pCR<sup>R</sup>II-TOP (Invitrogen) にサブクローニングされている。

## 【0086】

ゲルシフトアッセイ

5'末端が<sup>32</sup>Pで標識されたRNA (0.8 pmol) を20μlの緩衝液A中で75(Cで3分加温した後に室温で10分以上放置して、RNAの二次構造を形成させた。このRNA溶液に、20μlの緩衝液Aに溶かしたE. coli由来tRNA混合物の溶液(100μg/ml; Sigmaから購入したサンプルをゲル精製したもの)を加えて、5分以上室温で放置した後、その溶液を5μlずつ分注した。これに5μlのRaf-1 GST-RBD溶液(RBDの他、BSA 160μg/ml、1mM DTT、10%グリセロールを緩衝液Aに溶かしたもの)を加えて、37(Cで30分間インキュベートした後、非変性5%ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=39:1)電気泳動により解析した。

## 【0087】

電気泳動は、室温、定電圧(150V)で約2時間行った(ゲルサイズ16cm×16cm×1mm)。泳動用緩衝液の組成は、12.5mM Tris、125mM Glycineである。泳動後のゲルはゲルドライヤーを用いて乾燥させ、バイオイメージングアナライザー(BAS2500、富士フィルム)で解析した。

## 【0088】

その結果、予想通り、RNA XL 1分子とGST-RBD 2分子は効率よく複合体を形成することがゲルシフトのバンドパターンからわかった(図10)

c) また、GST-RBD非存在下のRNA XLのバンド移動度はRNA 9 A×2とほぼ同じだったことからも、XLはRNA 9 Aが二量化したものであることが確認できた（図10c及びd）。また、2分子のGST-RBDとの結合活性は、RNA 2×9 AよりもRNA XLの方が高いことがゲルシフトのパターンから示唆された。これは、GST tagで二量体化したRaf-1 RBDの配向とRNA XLのRBDへの結合部分がうまく合致しているためと考えられる。それに対してRNA 9 AはGST-RBDと1:1で結合した複合体を形成した（図10a）。また、Raf-1 RBDへの結合が無視できるほど弱いRNA OCは、GST-RBD濃度を増やしてもゲルシフトは認められなかった（図10b）。

## 【0089】

以上の結果から、5' Iyを位置選択的にRNA 9 Aに導入することによりGST-RBDに依存したRNA間での架橋反応性を付与できることが明らかとなり、5' Iyが分子間相互作用の解析に応用できること、そして、新たな機能をもつ核酸の創製において人工塩基対s・5' Iyが有用であることがわかった。

## 【0090】

参考例1 Raf-1タンパク質に特異的に結合するRNA アプタマーの単離

本参考例では、Raf-1タンパク質に特異的に結合するRNA アプタマーをin vitroセレクション法により単離した。このRNA分子は、タンパク質間相互作用を制御する細胞情報分子として機能することを示した。

## 【0091】

Raf-1タンパク質は、細胞質に発現される分子量74 kDaのセリン/トレオニンプロテインキナーゼであり、がん遺伝子として発見されたc-raf-1の遺伝子産物である[Rapp et al., 1988]。哺乳類細胞では、Raf-1のアイソフォームとしてA-Raf、B-Rafが存在することが知られている。Raf-1の活性化は、膜結合型タンパク質であるRasとの相互作用により引き起こされ、そしてRas以外のタンパク質もその制御機構に関与していることがわかってきており[Kolch, 2000]。Rasタンパ

ク質は、がん遺伝子として発見されたrasの遺伝子産物であり、GDPまたはGTPと結合する低分子量Gタンパク質である [Campbell et al., 1998]。他のGタンパク質と同様に、RasはGTPと結合した状態が活性化型である。このGTP結合型Rasは、Raf-1のアミノ酸残基51-131番からなるドメイン (Ras-binding domain; RBD) と結合することが同定されている。Raf-1の活性化には、Ras・Raf相互作用によって引き起こされる膜上での何らかの構造変化や、他の因子とのさらなる相互作用等が必要であると考えられている。

## 【0092】

本参考例では、in vitroセレクション法を用いて、Ras・Raf相互作用のみを選択的に阻害する制御分子の創製を試みた。核酸との相互作用が知られていないタンパク質に対しても、in vitroセレクション法を用いることで、そのタンパク質に特異的に結合するDNAやRNA分子 (アプタマー) を人工的に得ることができる。このin vitroセレクション法は、選択・増幅の一連の操作 (ラウンド) を繰り返すことにより、ランダムな配列を含んだ核酸のライブラリー (プール) から特定の機能を有する分子種を選別する手法である (図11) [Ellington & Szostak, 1990]。

## 【0093】

本参考例では、細胞情報伝達におけるRasとRaf-1の相互作用を選択的に制御する新規RNA分子の創製をめざし、in vitroセレクション法によりRaf-1 RBDに特異的に結合するRNAアプタマーを単離した。60ヌクレオチド ( $N_{60}$ ) のランダム配列を含むプールから得られたRNAアプタマーは、Raf-1 RBDとRasの相互作用を阻害した。しかし、このRNAアプタマーの阻害能は弱く、Rasに対して大過剰のRNAが阻害に必要となつた。そこでセレクション法を一部改良し、新たにデザインした45ヌクレオチド ( $N_{45}$ ) のRNAランダム配列を含むプールを用いてセレクションを行った。RT-PCR産物をTOPOTACloning Kit Dual (Invitrogen) によりTAクローニングベクター pCR<sup>®</sup> II - TOPOにサブクローニングし、個々のクローンの塩基配列を、dRhodamine T

erminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。その結果、さらに阻害能の高い二種類のRNAアブタマー (RNA 9A、RNA 9B) が得られた。

## 【0094】

とりわけ阻害能の高かったRNA 9Aは、RasおよびRaf-1を発現させたSf9細胞の膜画分およびHEK293細胞の細胞質画分を用いた無細胞系で、RasによるRaf-1の活性化を強く阻害し、人為的制御分子として機能することがわかった。またRNA 9Aは、Raf-1のアイソフォームであるB-RafのRBDに結合するにも関わらず(図12)、B-Raf RBDとRasの相互作用は阻害せず、Ras・Raf-1相互作用に対する阻害は特異的であることがわかった。また、RNaseによる限定分解、化学修飾を用いたRNAの二次構造解析、そしてRNAを切り詰めたRNAバリアントでの実験結果から、RNA 9Aはシュードノット構造を形成することが予測された(図13)。また、化学修飾を用いたフットプリンティングによりRaf-1 RBDと相互作用するRNA 9Aの領域を調べた結果、特定のループ部分がRaf-1 RBDとの結合表面に位置することが示唆された。

参考文献

以下の文献は、参考文献としてその内容が本明細書中に援用される。

## 【0095】

1. Battersby, T.R., Ang, D.N., Burgstaller, P., Jurczyk, S.C., Bower, M.T., Buchanan, D.D., Kennedy, R.T. & Benner, S.A. (1999) Quantitative Analysis of Receptors for Adenosine Nucleotides Obtained via In Vitro Selection from a Library Incorporating a Cationic Nucleotide Analog. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 9781-9789.
2. Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J. & Dier, C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17, 1395-1413.

3. Chen, P.S., Toribara, T.Y. & Warner, H. (1956) Microdetermination of Phosphorus. *Anal. Chem.* 28, 1756-1758.
4. Ellington, A.D. & Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822.
5. Fang, X., Cao, Z., Beck, T. & Tan, W. (2001) Molecular aptamer for real-time oncoprotein platelet-derived growth factor monitoring by fluorescence anisotropy. *Anal. Chem.* 73, 5752-5757.
6. Fujiwara, T., Kimoto, M., Sugiyama, H., Hirao, I. & Yokoyama, S. (2001) Synthesis of 6-(2-Thienyl)purine Nucleoside Derivatives That Form Unnatural Base Pairs with Pyridin-2-one Nucleosides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 2221-2223.
7. Golden, M.C., Collins, B.D., Willis, M.C. & Koch, T.H. (2000) Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers. *J. Biotechnol.* 81, 167-178.
8. Hirao, I., Madin, K., Endo, Y., Yokoyama, S. & Ellington, A.D. (2000) RNA aptamers That Bind to and Inhibit the Ribosome-inactivating Protein, Pepocin. *J. Biol. Chem.* 275, 4943-4948.
9. Hirao, I., Nojima, T., Mitsui, T. & Yokoyama, S. (2001) Synthesis of DNA templates containing the Fifth base, 2-Amino-6-(dimethylamino)purine, for Specific Transcription Involving Unnatural Base Pairs. *Chem. Lett.* 914-915.
10. Hirao, I., Ohtsuki, T., Fujiwara, T., Mitsui, T., Yokogawa, T., Okuni, T., Nakayama, K., Takio, K., Yabuki, T., Kigawa, T., Kodama, K., Yokogawa, T., Nishikawa, K. & Yokoyama, S. (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogs into proteins. *Nat. Biotechnol.* 20, 177-182.
11. Inouye, K., Mizutani, S., Koide, H. & Kaziro, Y. (2000) Formation of the Ras Dimer Is Essential for Raf-1 Activation. *J. Biol. Chem.* 275, 3737-3740.

12. Ishikawa, M., Hirao, I. & Yokoyama, S. (2000) Synthesis of 3-(2-deoxy-(-D-ribofuranosyl)pyridin-2-one and 2-amino-6-(N,N-dimethylamino)-9-(2-deoxy-(-D-ribofuranosyl)purine derivatives for an unnatural base pair. *Tetrahedron Lett.* 41, 3931-3034.

13. Jensen, K.B., Atkinson, B.L., Willis, M.C., Koeh, T.D. & Gold, L. (1995) Using in vitro selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein to high-affinity RNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12220-12224.

14. Jhaveri, S., Rajendran, M. & Ellington, A.D. (2000) In vitro selection of signaling aptamers. *Nat. Biotechnol.* 18, 1293-1297.

15. Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 351, 289-305.

16. Koyama, S., Chen, Y.-W., Ikeda, M., Muslin, A.J., Williams, L.T. & Kikuchi, A. (1996) Ras-interacting domain of RGL blocks Ras-dependent signal transduction in Xenopus oocytes. *FEBS Lett.* 380, 113-117.

17. Latham, J.A., Johnson, R. & Toole, J.J. (1994) The application of a modified nucleotide in aptamer selection: novel thrombin aptamers containing 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Res.* 22, 2817-2822.

18. Ludwig, J., Eckstein, F., *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 631-635.

19. Matulic-Adamic, J., Beigelman, L., *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38, 203-206.

20. Meisenheimer, K.M. & Koch, T.H. (1997) Photocross-Linking of Nucleic Acids to Associated Proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32, 101-40.

21. Morales, J.C. & Kool, E.T. (1999) Minor Groove Interactions between Polymerase and DNA: More Essential to Replication than Watson-Crick Hydrogen Bonds? *J. Am. Chem. Soc.* 121, 2323-2324.

22. Ohtsuki, T., Kimoto, M., Ishikawa, M., Mitsui, T., Hirao, I. & Yokoyama, S. (2001) Unnatural base pairs for specific transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 4922-4925.

23. Piccirilli, J.A., Krauch, T., Moroney, S.E. & Benner, S.A. (1990) Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet. Nature 343, 33-37.

24. Piccirilli, J.A., Moroney, S.E. & Benner, S.A. (1991) A C-nucleotide base pair: methylpseudouridine-directed incorporation of formycin triphosphate into RNA catalyzed by T7 RNA polymerase. Biochemistry 30, 10350-10356.

25. Rapp, U.R., Heidecker, G., Huleihel, M., Cleverland, J.L., Choi, W.C., Pawson, T., Ihle, J.N. & Anderson, W.B. (1988) raf family serine/threonine protein kinases in mitogen signal transduction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 53, 173-184.

26. Switzer, C.Y., Moreney, S.E. & Benner, S.A. (1993) Enzymatic Recognition of the Base Pair between Isocytidine and Isoguanosine. Biochemistry 32, 10489-10496.

27. Tae, E.L., Wu, Y., Xia, G., Schultz, P.G. & Romesberg, F.E. (2001) Efforts toward Expansion of the Genetic Alphabet: Replication of RNA with Three Base Pairs. J. Am. Chem. Soc. 123, 7439-7440.

28. Wu, Y., Ogawa, A.K., Berger, M., McMinn, D.L., Schultz, P.G. & Romesberg, F.E. (2000) Efforts toward Expansion of the Genetic Alphabet: Optimization of Interbase Hydrophobic Interactions. J. Am. Chem. Soc. 122, 7621-7632.

29. Yamamoto, R., Baba, T. & Kumar, P.K. (2000) Molecular beacon aptamer fluorescences in the presence of Tat protein of HIV-1. Genes Cells 5, 389-396.

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

Japan Science and Technology Corporation

<120> Nucleic acid having a novel unnatural base and use thereof

<130> 021297

<160> 7

<210> 1

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> RNA aptamer

<400> 1

gggaguggag gaauucaucg aggcauaugu cgacuccguc uuuccucaaa ccaguuauaa 60

auugguuuua gcauaugccu uagcgacagc aagcuucugc 100

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed primer for PCR

<400> 2

ggtaatacga ctcactatag ggagtgagg aattcatcg 39

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed primer for PCR

<400> 3

gcagaagctt gctgtcgcta aggcatatg 29

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<221> n means 2-amino-6-(2-thienyl)-purine-9-yl

<223> Designed primer for PCR

<400> 4

gcagaagctt gctgtcncta aggcatatg 29

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<221> n means 2-amino-6-(2-thienyl)-purine-9-yl

<223> Designed primer for PCR

<400> 5

gcagaagctt gctntcgcta aggcatatg 29

<210> 6

<211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <221> n means 2-amino-6-(2-thienyl)-purine-9-yl

<223> Designed primer for PCR

<400> 6

gcagaagcnt gctgtcgcta aggcatatg 29

<210> 7  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <221> n means 2-amino-6-(2-thienyl)-purine-9-yl

<223> Designed primer for PCR

<400> 7

gcagaagcnt gctgtcncta aggcatatg 29

### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

図1は、既知の天然型塩基対と人工塩基対を示す。a) ワトソン・クリック塩基対。b) Bennerらによって報告された水素結合様式を変えた塩基対。c) Koolらによって報告された水素結合を持たない塩基対。d) RomesbergとSchultzらによって報告された疎水性塩基対。Rはsugarを示す。

#### 【図2】

図2は、水素結合様式の違いと立体障害（シェイプフィッティング）の概念をもとにデザインされた人工塩基対を示す。a) 2-アミノ-6-ジメチルアミノ

プリン (x) とピリジン-2-オン (y) の塩基対。b) xと天然型ピリミジン塩基との塩基対。c) 2-アミノ-6-チエニルプリン (s) とyの塩基対。d) sと天然型ピリミジン塩基との塩基対。

## 【図3】

図3は、本発明の化合物、3-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステル及び3-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-5-(2-フェニルエチニル)-ピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステルの合成スキームを示す。

## 【図4】

図4は、本発明の化合物、3-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステル(5IyTP)の構造及びUV吸収を示す。

- a) 3-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステル(5IyTP)。
- b) 10 mMリン酸緩衝液(pH7)中の5IyTPのUV吸収。(max = 318nm)

## 【図5】

図5は、RNA 9Aに5Iyを位置選択的導入するための錆型DNAを調製する際に用いたプライマー(a)とRNA 9Aの配列(b)を示す。(a)において、非天然型塩基sを含む箇所はsで示した。(b)において、RNA 9A中の5Iyに導入する配列部分を下線で示した。

## 【図6】

図6は、RNA 9Aへの5Iyの位置選択的導入を示す。

- a) 0.25mMの5Iyが存在下(+)もしくは非存在下(-)で転写反応を行い、その反応産物を電気泳動した場合のオートラジオグラム。5Iyが導入される位置および全長の位置を左横に示した。

- b) RNA 9Aの二次構造上に、5Iyが導入される箇所を黒丸で示した。

## 【図7】

図7は、転写反応産物の塩基組成分析を示す。0.25mM 5Iyの存在下(c-e, h-j)もしくは非存在下(b, g)で転写された反応産物(全長:図6参照)をRNase T<sub>2</sub>で完全分解した後、2D-TLCで解析した。それぞれの塩基に相当するスポットの位置をa)、f)に示した。b-e) [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATPを用いて標識した場合。g-j) [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] GTPを用いて標識した場合。それぞれのスポットを定量した結果は、表1に示した。

#### 【図8】

図8は、5Iyを位置選択的に含むRNAの架橋反応を示す。各RNAとGST-RBDを混合して37°Cで30分間インキュベートした後、氷上でUVトランスイルミネーターを用いて、UV(312nm)を1時間照射した。そのサンプルを電気泳動した場合のオートラジオグラム。RNA 9A(5Iy84)、9A(5Iy87)、9A(5Iy92)、9A(5Iy84/92)は、塩基が84、87、92、84と92の位置に5Iyが導入されたRNA。9A(5Iy)、9A(5IU)については、表2参照。UV照射により生じた架橋反応産物のバンドの位置を左横に示した。

#### 【図9】

図9は、RNA 9A(5Iy84)と9A(5Iy87)の架橋反応を示す。各RNAをGST-RBDの存在下(レーン2-4, 6-8)もしくは非存在下(レーン1, 4)でUVを照射した。照射後にプロテナーゼK処理(PK)もしくはフェノール・クロロホルム抽出(pheno1)によりタンパク質を除去したが、架橋反応産物のバンドに変化はなかった(レーン3, 4, 7, 8)。

#### 【図10】

図10は、RNA(5Iy87)の架橋反応産物XLは9Aが二量化したもので、2分子のGST-RBDと結合することを示す。a-d) 各RNAとGST-RBDとの結合をゲルシフトアッセイにより解析した。c) 各RNA(a-d)の配列を示した。RNA 9Aの配列と異なる部分を太字・下線で示した。

#### 【図11】

図11は、Raf-1 RBDに結合するRNAアプタマーのin vitroセレクションの概略を示す。タンパク質がニトロセルロースフィルターに吸着

することを利用したフィルター結合法によるセレクションを用いた。ランダム配列を含んだRNAプールからRaf-1 RBDに結合したRNAを選別し、RT-PCRと転写反応により次のラウンドのRNAプールが増幅される。この一連の操作を繰り返すことで、Raf-1 RBDに結合するRNA分子が濃縮される。

【図12】

図12は、各RNAアブタマーのタンパク質への結合曲線を示す。各RNAアブタマー(2 nM)が種々の濃度のタンパク質へ結合する効率(Binding %)をフィルター結合法により求めてプロットした。

RNA 9AのRaf-1 GST-RBDへの結合：黒丸

RNA 9AのB-Raf GST-RBDへの結合：白丸

RNA 9AのRGL GST-RBDへの結合：×

RNA 9BのRaf-1 GST-RBDへの結合：黒四角

RNA 21.01のRaf-1 GST-RBDへの結合：黒三角

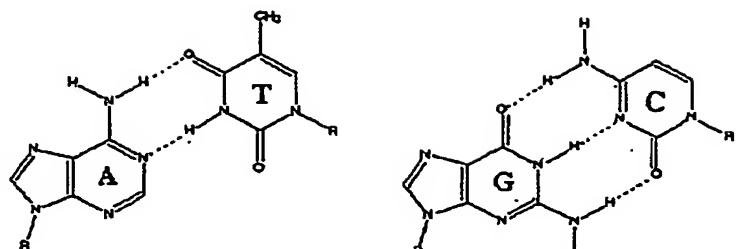
【図13】

図13は、RNA 9Aの二次構造を示す。RNaseによる限定分解と化学修飾を用いて、RNA 9Aの二次構造を予測した。固定領域を小文字で、ランダム領域を大文字で示した。RNaseによる切断パターンとアルキル化剤(DMSとCMCT)による修飾パターンを二次構造上にそれぞれマッピングした。Raf-1 GST-RBDの存在下、化学修飾がフットプリントされた配列部分を白丸で示した。

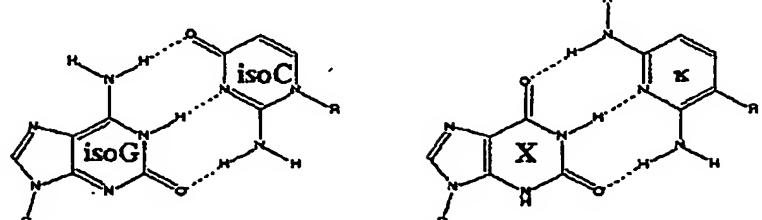
【書類名】 図面

【図1】

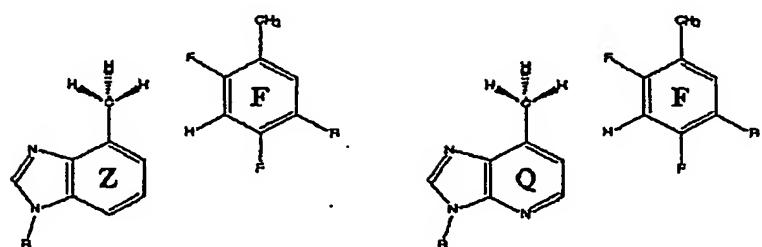
a)



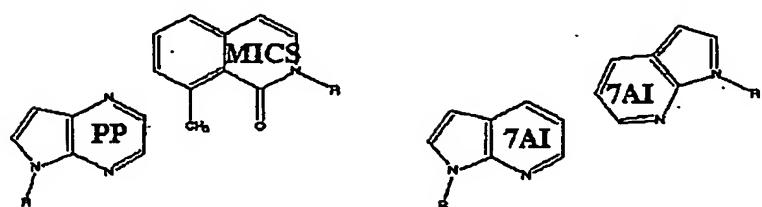
b)



c)

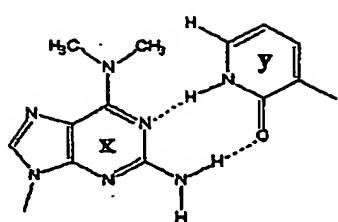


d)

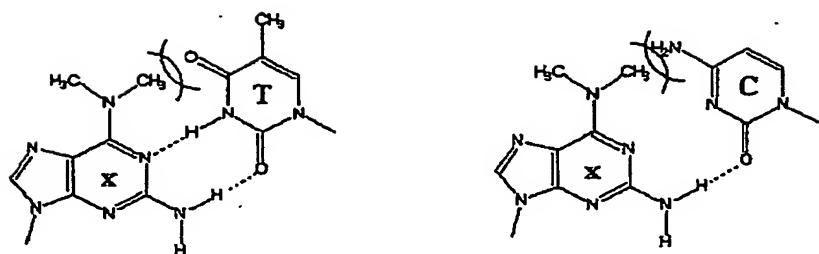


【図2】

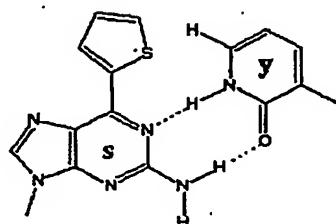
a)



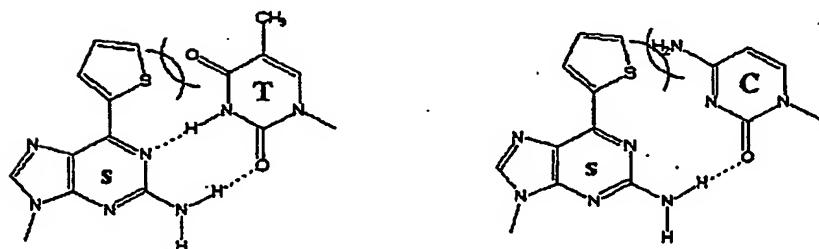
b)



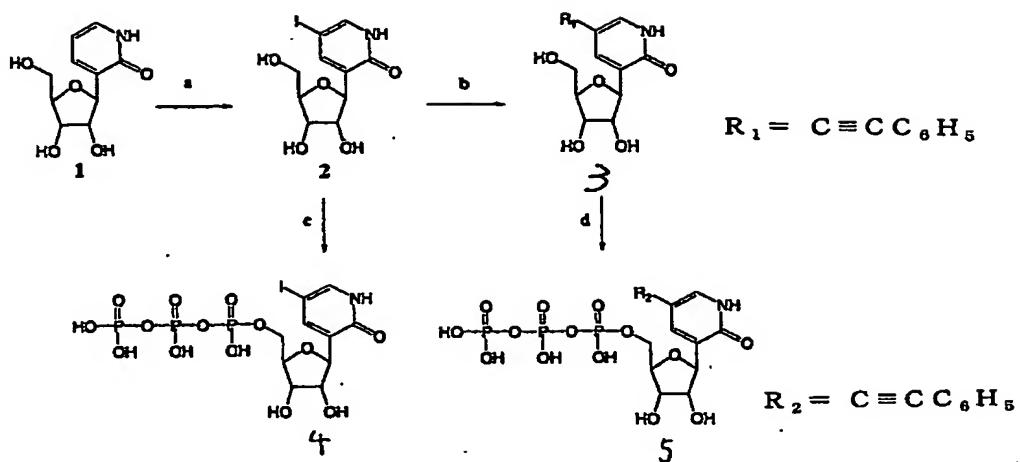
c)



d)

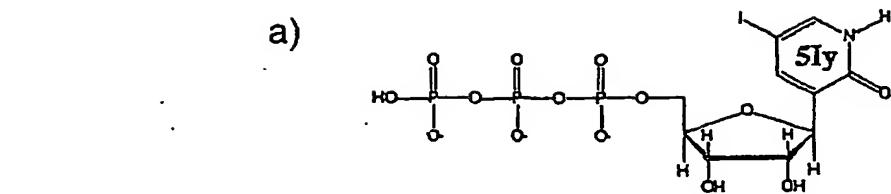


【図3】

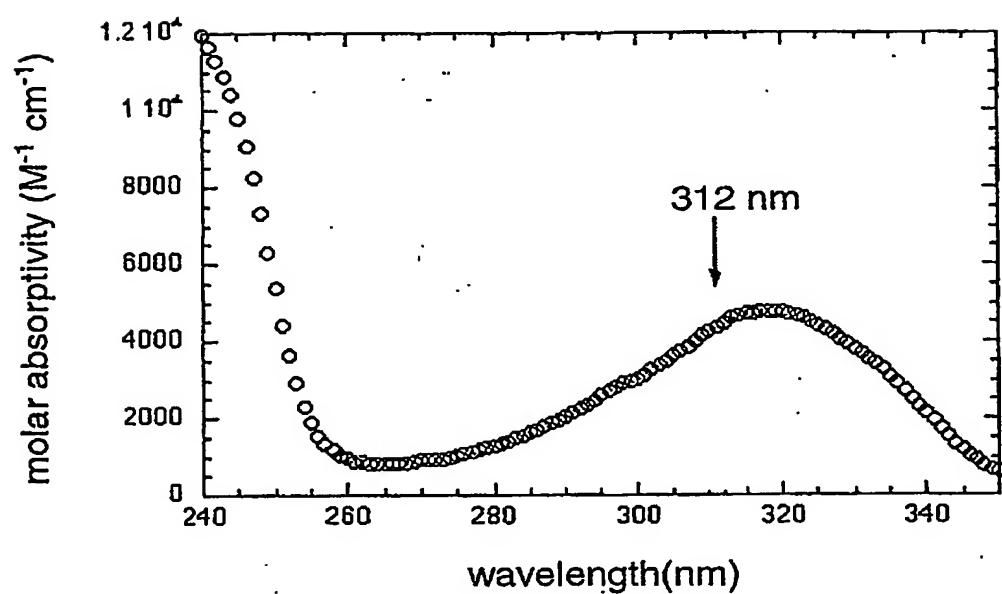


(a)  $I_2$ ,  $KI$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $100^\circ C$ , 4 h. (b)  $CF_3CONHCH_2CCH_2Pd(PPh_3)_4$ ,  $CuI$ ,  $Et_3N$ ,  $DMF$ , rt, 4-6 h. (c) (1)  $POCl_3$ ,  $(CH_3O)_2PO$ ,  $0^\circ C$ , 2 h. (2)  $(n-Bu_3NH)_2P_2O_7$ ,  $0^\circ C$ , 10 min. (d) (1)  $POCl_3$ , 1,3-bis(dimethylamino)naphthalene,  $(CH_3O)_2PO$ ,  $0^\circ C$ , 2 h. (2)  $(n-Bu_3NH)_2P_2O_7$ ,  $0^\circ C$ , 10 min. (3) conc. $NH_4OH$ , rt, 10 h.

【図4】



b)



【図5】

a)

5'-end primer; 39-mer

39.45 : 5'-GGTAATAACGACTCACTATAGGGAGTGGAGGAATTCACTCG

3'-end primer; 29-mer

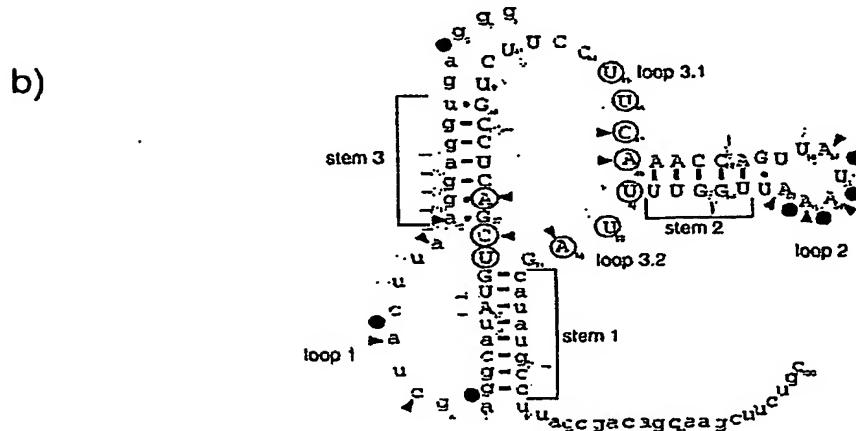
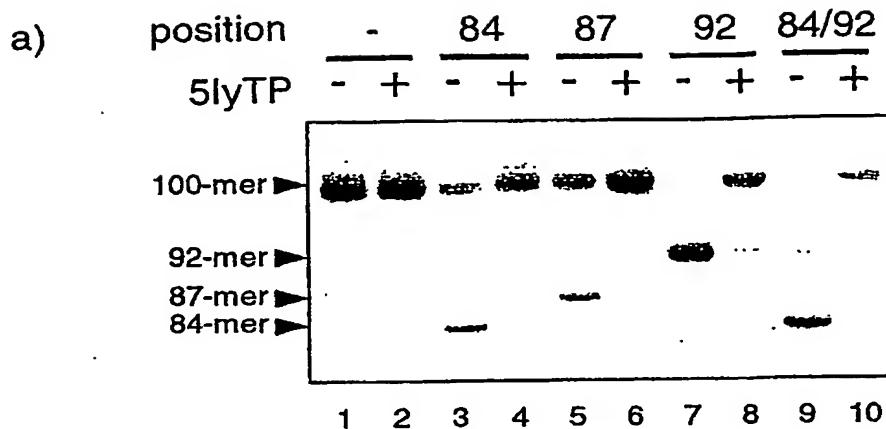
29.45 : 5'-GCAGAACGCTTGCCTGCTAAGGCATATG

29.45s84 : 5'-GCAGAACGCTTGCTCTAAGGCATATG29.45s87 : 5'-GCAGAACGCTTGCTCGCTAAGGCATATG29.45s92 : 5'-GCAGAACGCTGCTGCTAAGGCATATG29.45s84/92 : 5'-GCAGAACGCTGCTGTCSCTAAGGCATATG

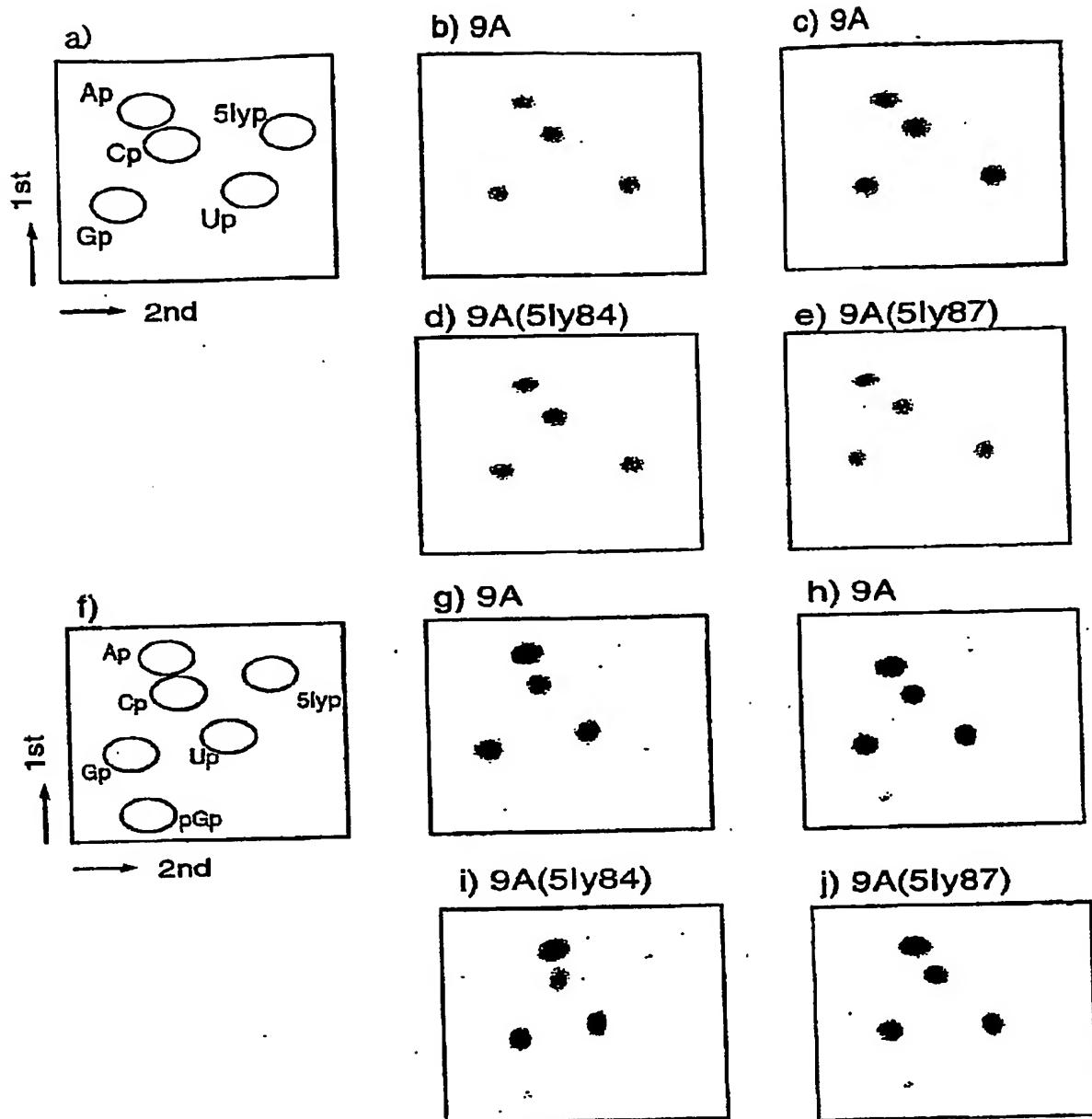
b)

5' - GGGAGUGGGAG GAAUUCAUCG AGGCAUAUGU CGACUCCGUC UUCCUUCAAA  
CCAGUUUAUA AUUGGUUUUA GCAUAUGCCU UAGCGACAGC AAGCUUCUGC

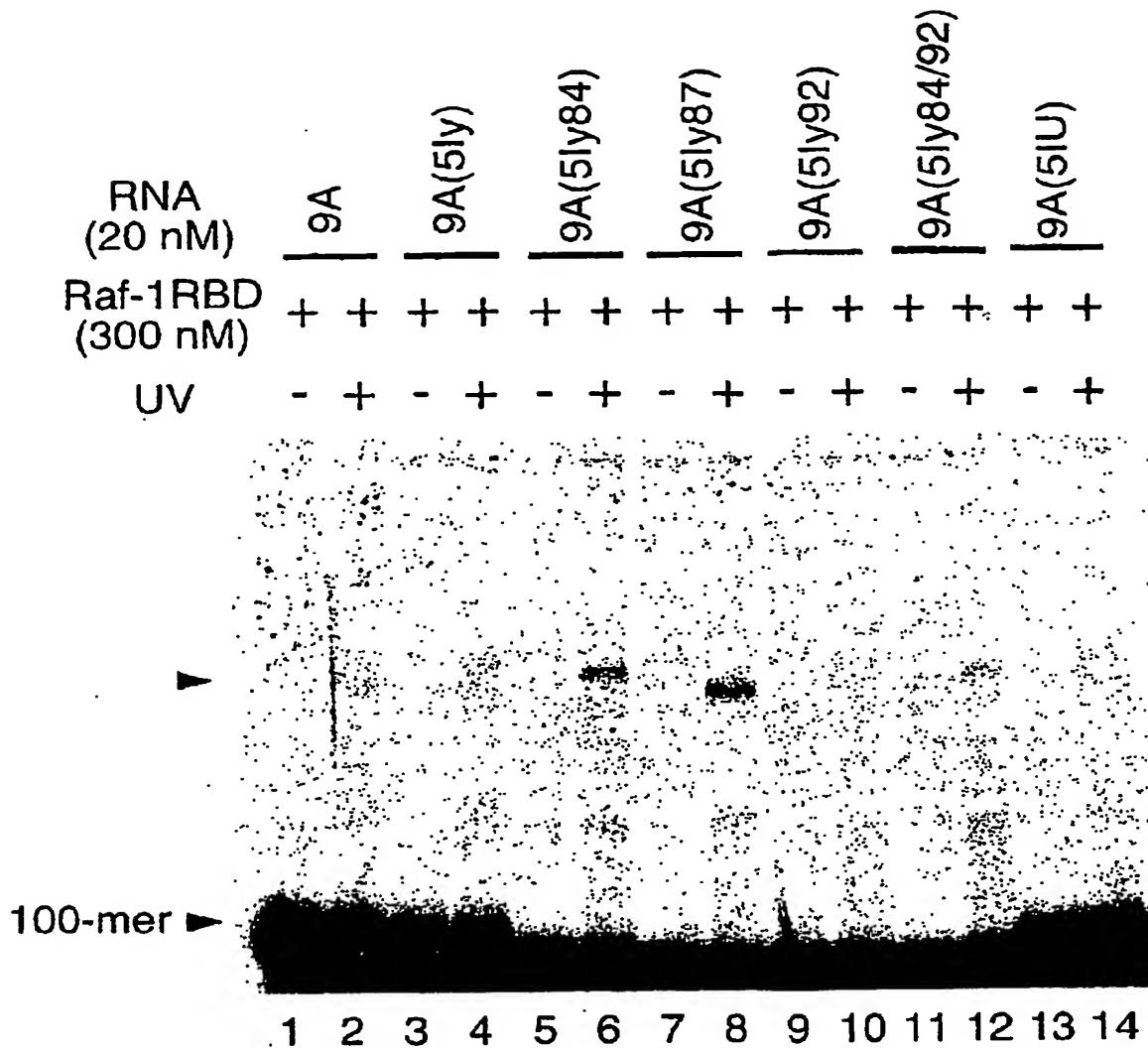
【図6】



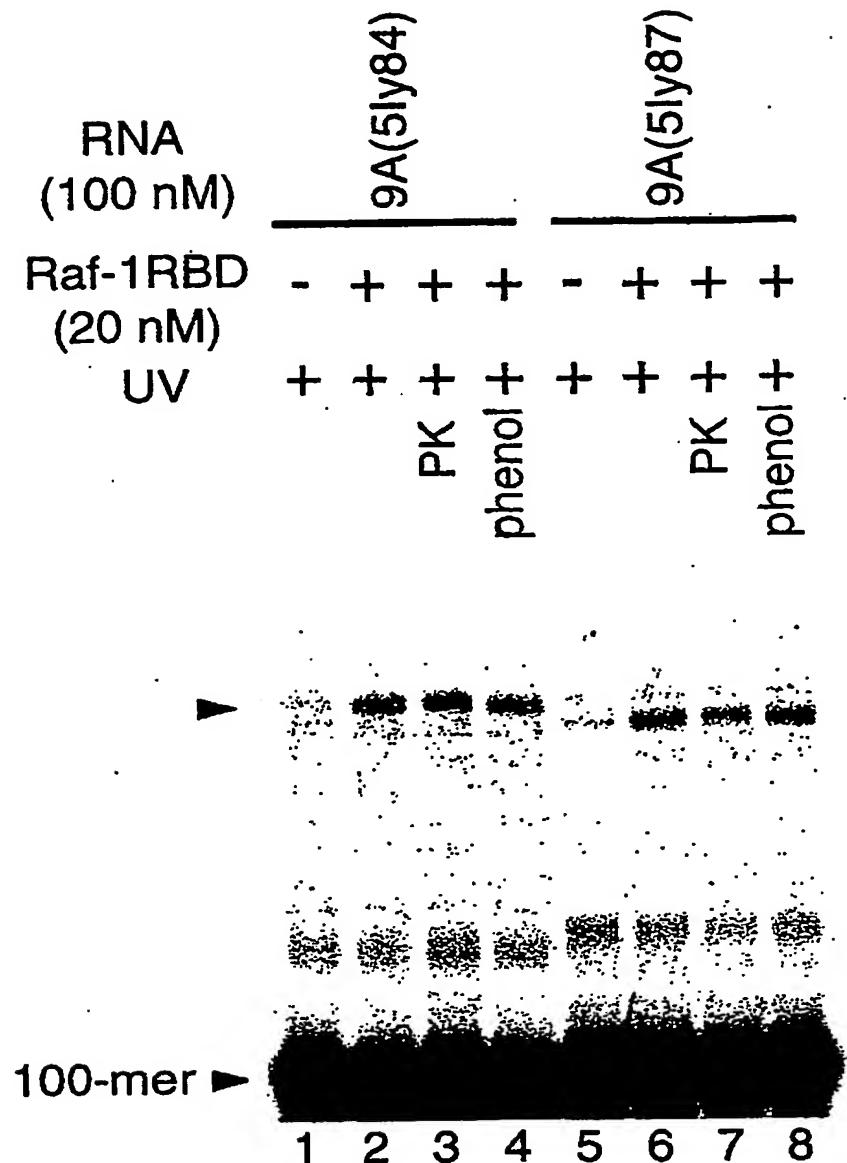
【図7】



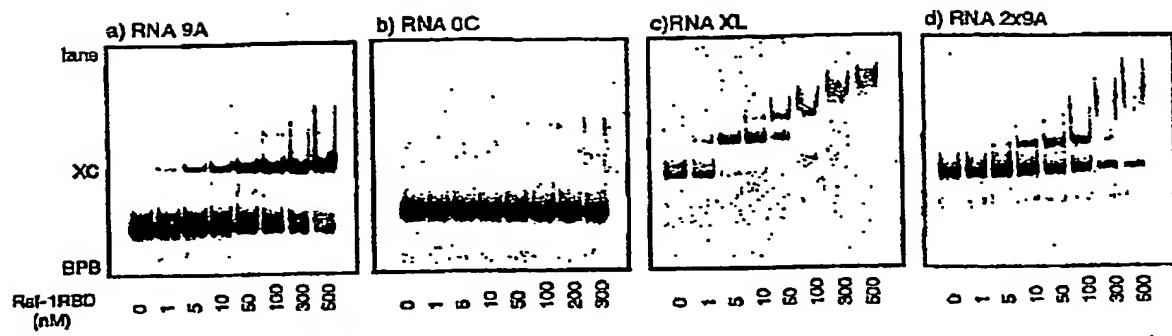
【図8】



【図9】



【図10】



e) RNA 9A :100-mer

5'-GGGAGUGGAGGAAAUUCAUCAGGCAU[-N<sub>46</sub>]CAUAUGCCUUAGCCACAGCAAGCUCUGC-3'  
AUGUCGACUCCGCUUUCUCAACCAAGUUAUAAAUJGGGUUJAG

RNA 9A(51y87) :100-mer

5'-GGGAGUGGAGGAAAUUCAUCAGGCAU[-N<sub>45</sub>]cauaugccuuagcga51yACCAAGCUUCUOC-3'

RNA 2x9A 200-mer

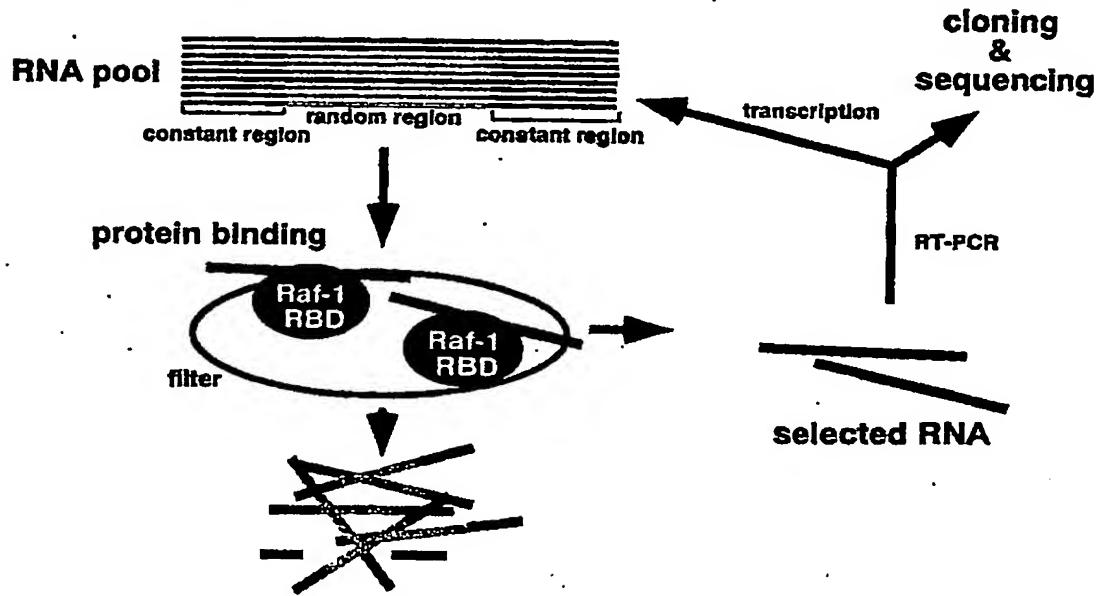
5'-GGGAGUGGAGGAAAUUCAUCAGGCAU[-N<sub>46</sub>]CAUAUGCCUUAGCGAACCCUUCUCC-  
 -GGGAGUGGAGGAAAUUCAUCAGGCAU[-N<sub>45</sub>]CAUAUGCCUUUGCCUGGAGGUCCUCU-3'

RNA 0C :100-mer

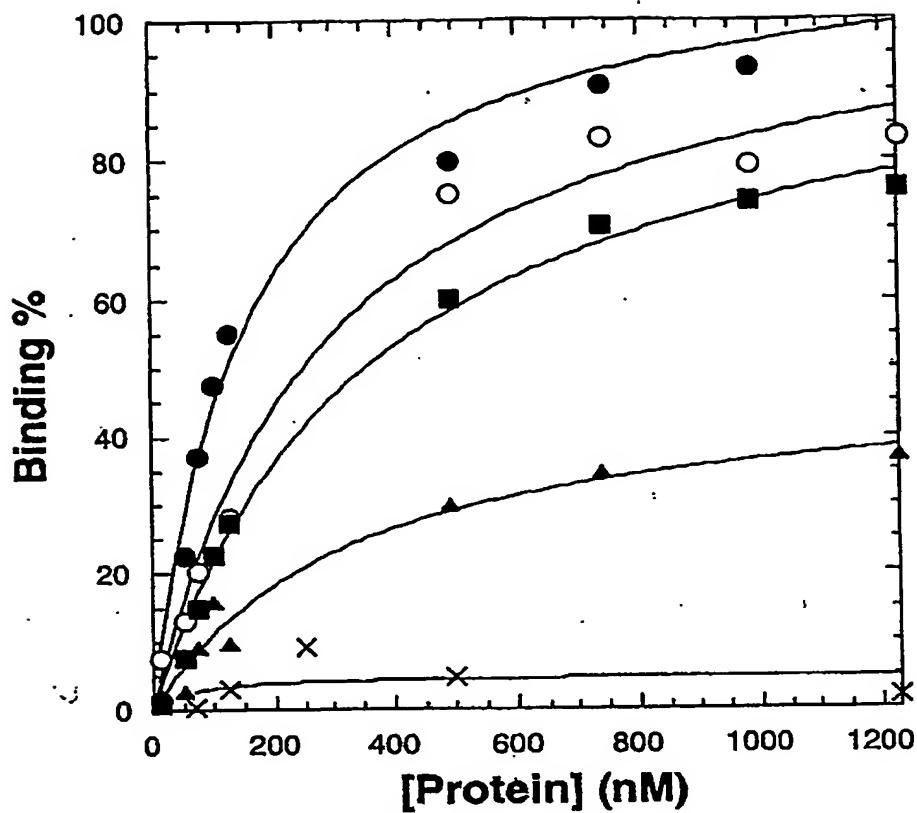
5'-GGGAGUGGAGGAAAUUCAUCAGGCAU[-N<sub>45</sub>]CAUAUGCCUUAGCGAACCCUUCUCC-3'  
GUCCGAACCUACCUACUUAGCUAGGUAGCUAGCUACCCGUUACG

RNA XL : cross-linking product generated from two molecules of 9A(51y87)

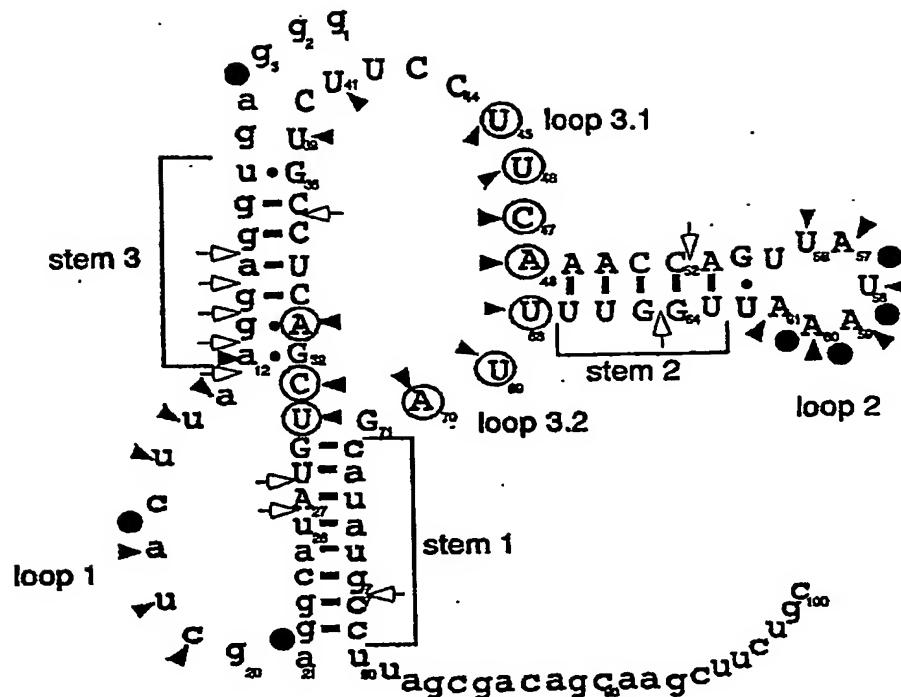
【図11】



【図12】



【図13】



- ▷ RNase V1 cleavage
- Mung Bean Nuclease cleavage
- ▲ CMCT modification
- ◀ DMS modification
- (N) protection from chemical modification by the Raf-1 GST-RBD

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、非天然型塩基を有するヌクレオシド又はヌクレオチドを提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドは、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有する。好ましくは、前記塩基の5位が、以下の

- 1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基；
- 2) アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体；
- 3) ピオチン；あるいは
- 4) フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、テトラメチル-6-カルボキシローダミン、及びそれらの誘導体から選択される蛍光分子からなるグループから選択される置換基によって置換されている。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 埼玉県和光市広沢2番1号

氏 名 理化学研究所

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団